

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	08 NOV 2000
WIPO	PCT

EP09545

EJU

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
 einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 42 230.3
Anmeldetag: 03. September 1999
Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Wolf-Georg Forssmann,
 Hannover/DE
Bezeichnung: Verfahren zur Anwendung natriuretischer
 Peptide als antibiotisch wirksame Substanzen
 zur Behandlung von bakteriellen Infektionen
IPC: A 61 K 38/17

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
 Im Auftrag

Patentantrag:

Verfahren zur Anwendung natriuretischer Peptide als antibiotisch wirksame Substanzen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen

Beschreibung:

Die Erfindung betrifft die Anwendung natriuretischer Peptide (ANP, BNP, CNP), als antibiotisch wirksame Peptid-Präparate. Die Gewinnung erfolgt durch eine chemische Peptid-Synthese oder biotechnologische Herstellung und Konfektionierung als galenisch zubereitete Substanz zur medizinischen und tiermedizinischen Verwendung als Medikament.

Bei den Peptiden, die Gegenstand dieses Patentantrages sind, handelt es sich um Mitglieder der Familie der natriuretischen Peptide. Atriales natriuretisches Peptid (ANP) der Ratte (Flynn et al., 1983), des Schweins (Forssmann et al., 1983, 1984), und des Menschen (Kangawa and Matsuo, 1984) wurde in seiner Primärstruktur beschrieben. Die Nierenform des ANP, Urodilatin wurde von Forssmann und Mitarbeitern zuerst 1988 entdeckt (Schulz-Knappe et al., 1988). Das Homologe des atrialen natriuretischen Peptides (ANP), das Brain-type natriuretische Peptid (BNP) wurde von Sudoh und Mitarbeitern 1988 erstmals isoliert. Eine antibiotische Wirksamkeit wurde für natriuretische Peptide bislang nicht vermutet. Für den Nachweis einer antimikrobiellen Aktivität wird vorzugsweise ein Test durchgeführt, der für basische Peptide geeignet ist. Hier ist der Wachstumshemmtest von Lehrer und Mitarbeitern geeignet, um eine antibiotische Aktivität zu erkennen (Lehrer et al., J. Immun. Methods, Vol. 137, S. 167 1991).

Humanes ANP 99-126 und Urodilat wirken überraschenderweise auf +grampositive Bakterien wie B. subtilis, M. luteus und S. carnosus, und auf gramnegative Bakterien wie E. coli, N. cinerea und P. fluorescens sowie die Hefe S. cerevisiae wachstumshemmend. Ebenso wirkt humanes BNP-32 in der gleichen Art auf grampositive Bakterien wie B. subtilis, M. luteus und S. carnosus und gramnegative Bakterien wie E. coli, N. cinerea und P. fluorescens sowie die Hefe S. cerevisiae, wachstumshemmend. Die wachstumsmodulierende Eigenschaft dieser spezifischen natriuretischen Peptide auf bestimmte Keime wurde bei der Entwicklung des hier vorgestellten Verfahrens erstmals eindeutig nachgewiesen.

Über die chemische und biotechnologische Synthese können die natriuretischen Peptide in reinster und biologisch aktiver Form hergestellt, und als Medikament eingesetzt werden.

Die erfundungsgemäßen Stoffe, bestehend aus den synthetischen und rekombinanten Produkten, können die bakterielle Flora des Darms, der Haut und anderer bakteriell besiedelter Körperzonen verändern und bei einer bakteriellen Fehlbesiedlung zu einer Verbesserung der Keimflora führen. Die dargestellten Reinstoffe lassen sich daher zur Bekämpfung von Durchfällen, insbesondere Säuglingsdurchfällen, also Infektionen des Magendarintraktes, zusätzlich aber auch des Respirationssystems, des Urogenitalapparates und bei Hautinfektionen, verwenden. Die Präparate sind als Zusatzstoffe für Lebensmittel oder als Therapeutika zu verwenden und dienen bei der Herstellung von Lebensmitteln als Hilfsstoffe, insbesondere bei Lebensmitteln, die durch Gärung und andere bakterielle Prozesse hergestellt werden. Bei den patentgemäßen Präparaten handelt es sich um natürliche Konservierungsmittel.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen und den folgenden Abbildungen, auf die in den Beispielen Bezug genommen wird, erläutert:

Es zeigen

Wachstumshemmtest von ANP

Radialer Diffusions-Wachstumshemmtest mit *Streptococcus carnosus* und *N. cinerea* nach Lehrer und Mitarbeitern (Lehrer et al., J Immun Methods, Vol 137, S. 167 1991). Der Wachstumshemmtest ist für den Nachweis antibiotischer Peptide optimal, da als Trägermaterial statt des sonst üblichen Agar-Agars eine spezielle Agarose verwendet wurde, die keine fixierten Ladungszentren enthält. Nachweisbar sind Hemmhöfe nach Auftrag von 1 μ g ANP (beide Keime).

Abb.1:

Wachstumshemmtest von Urodilatin

Radialer Diffusions-Wachstumshemmtest mit *Streptococcus carnosus* und *N. cinerea* nach Lehrer und Mitarbeitern (Lehrer et al., J Immun Methods, Vol 137, S. 167 1991). Der Wachstumshemmtest ist für den Nachweis antibiotischer Peptide optimal, da als Trägermaterial statt des sonst üblichen Agar-Agars eine spezielle Agarose verwendet wurde, die keine fixierten Ladungszentren enthält. Nachweisbar sind Hemmhöfe nach Auftrag von 1 μ g ANP (beide Keime).

Abb. 2:

Wachstumshemmtest von BNP-32

Radialer Diffusions-Wachstumshemmtest mit *Streptococcus carnosus* und *N. cinerea* nach Lehrer und Mitarbeitern (Lehrer et al., J Immun Methods, Vol 137, S. 167 1991). Der Wachstumshemmtest ist für den Nachweis antibiotischer Peptide optimal, da als Trägermaterial statt des sonst üblichen Agar-Agars eine spezielle Agarose verwendet wurde, die keine fixierten Ladungszentren enthält. Nachweisbar sind Hemmhöfe nach Auftrag von 0,1 μ g BNP (beide Keime).

Abb. 3:

Wachstumshemmtest von CNP

Radialer Diffusions-Wachstumshemmtest mit *Streptococcus carnosus* und *E.coli* nach Lehrer und Mitarbeitern (Lehrer et al., J Immun Methods, Vol 137, S. 167 1991). Der Wachstumshemmtest ist für den Nachweis antibiotischer Peptide optimal, da als Trägermaterial statt des sonst üblichen Agar-Agars eine spezielle Agarose verwendet wurde, die keine fixierten Ladungszentren enthält. Nachweisbar sind Hemmhöfe nach Auftrag von 7 μg (*S.carnosus*) und 11 μg (*E.coli*) CNP.

Abb. 4:

Beispiel 1: Chemische Synthese der antibiotisch aktiven Peptide ANP, BNP, Urodilatin und CNP

Strategie der Synthese humaner natriuretischer Peptide:

Für die Synthese der Peptide mit den Sequenzen:

Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-

Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (ANP/CDD)

Ser-Phe-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly-Cys-Phe-Gly-Arg-Lys-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Ser-Ser-
Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His (BNP)

My-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-
Gly-Cys (CNP)

Thr-Ala-Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-

Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (Urodilatin)

wird die Durchflußmethode (Atherton und Sheppard, in "Solid Phase Peptide Synthesis", IRL-Press, Oxford 1989) angewendet. Die genannte Peptidsequenz wird mit Hilfe einer automatischen Peptid-Syntheseapparatur (Milligen 9050) unter Verwendung von Fmoc-Aminosäuren synthetisiert. Die Fmoc-Aminosäuren waren L-konfiguriert und in vierfachem Überschuß eingesetzt.

Folgende Aminosäurederviate wurden für die Synthese verwendet:

Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Arg (Pmc), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Leu, Fmoc-Phe, Fmoc-Ile, Fmoc-Val. Es fehlen Cys, Gly, Met, Asp

Die Synthese wird mit trägergebundener C-terminaler Aminosäure (0,091 mmol Alanin/g Harz) an Fmoc-L-Ala-PEG-PS (Millipore) durchgeführt. Alle Kopplungen von Aminosäurederivaten wird in Anwesenheit von O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluorborat (TBTU), 1-Hydroxybenzotriazol, Diisopropylethylamin durchgeführt. Folgende Synthesezyklen werden verwendet:

- Fmoc-Abspaltung mit 20% Piperidin in DMF für 10 min

- Waschen mit DMF für 12 min
- Acylierung für 30 min
- Waschen mit DMF für 8 min

Die Synthese wird durch kontinuierliche UV-Detektion verfolgt. Die Synthese wird mit der Abspaltung des N-terminalen Fmoc-Restes abgeschlossen. Das harzgebundene Peptid wird dreimal mit je 50 ml Isopropanol, Eisessig, Isopropanol und Diethylether gewaschen und getrocknet.

Die Peptide werden vom Trägerharz durch Zugabe einer Mischung von TFA-Ethandithiol-Wasser 94:3:3 (v/v/v) abgespalten und mit Ether gefällt.

Die Reinigung des Peptides erfolgt mittels Reversed-Phase-HPLC mit einer C18-Säule (Vydac, 10 μ mm 300 Å, 20 x 250 mm, Detektion bei 230 nm). Als Laufmittel wurden verwendet: Eluent A: Eluent A: 0,06 % Trifluoressigsäure (TFA), Eluent B: 0,06% TFA in Acetonitril/Wasser (4:1). Die Flußrate ist 10 ml/min, der Gradient ist folgendermaßen: von 20 % B bis 80 % B innerhalb von 70 min. Die reinen Fraktionen werden gepoolt und lyophilisiert.

Die Reinheit und Identität der Peptide wird mit Hilfe der Massenspektrometrie (Quadrupol-Ektrospraymassenspektrometrie, Sciex API III, Perkin Elmer) und Sequenzierung in einem Gasphasensequenator (Model 470, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt sowie mit Kapillarzonenelektrophorese überprüft. Die biologische Aktivität wird durch den Wachstumshemmtest kontrolliert.

Beispiel 2: Rekombinante Herstellung

Die rekombinante Herstellung erfolgt nach üblichen Methoden und führt zu gleichartig reinem Peptid zur galenischen Verwendung.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Anwendung von Natriubiotika in reiner Form zur Verwendung als antibiotisches Pharmakon zur Behandlung einer pathogen veränderten bakteriellen Flora in Magendarmtrakt, respiratorischem und urogenitalem System sowie der Haut. Verwendung der Natriubiotika in der Lebensmitteltechnologie als Hilfsstoff bei Gärprozessen und als Konservierungsstoff.
2. Verwendung der Natriubiotika in geeigneter Form in Mengen von 1 µg-1 mg pro Einheit, zubereitet für Infusionen, Salben, Tabletten, Sprays, „slow release“-Kapseln und ähnlichen Präparationen.
3. Verwendung des Präparates gemäß Anspruch 1-2 zur Therapie von Veränderungen der Darmflora und ihre Beeinflussung.
4. Verwendung des Präparates gemäß Anspruch 1-2 zur Behandlung von mikrobiell ausgelösten Hauterkrankungen.
5. Verwendung des Präparates gemäß Anspruch 1-2 zur Behandlung von Abberationen der humanen Vaginalflora.
6. Verwendung des Präparates gemäß Anspruch 1-2 als Konservierungsstoff von Lebensmitteln oder anderen verderblichen Waren.
7. Verwendung des Präparates gemäß Anspruch 1-2 als Hilfsstoff bei industriellen Gärprozessen, z.B. bei der Bierherstellung, bei der Joghurtproduktion bei der Sauerkrautherstellung usw, um die vorliegende Bakterienflora zu modifizieren.
8. Verwendung des Präparates gemäß Anspruch 1-2 als Konservierungsmittel von Lebens- und Futtermitteln.

Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft antibiotisch wirksame natriuretische Peptide zur Verwendung als antibiotisch wirksame Präparate, hergestellt mittels biotechnologischer und rekombinanter Verfahren und chemischer Synthese. Die antibiotisch wirksamen Peptide werden Natriubiotika benannt. Diese Natriubiotika können nach chemischer Peptidsynthese und in geeigneter galenischer Zubereitung als Medikamente/Tiermedikamente und Lebensmittelzusätze verwendet werden.

